مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۲، شماره ۲، سال ۱۳۹۵

ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) براساس صفات مورفولوژیک و نشانگرهای CDDP و SCoT

Evaluation of Genetic Diversity of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Genotypes Based on Morphological Traits and CDDP and SCoT Markers

زهرا حاجی برات[1]، عباس سعیدی[2] و رضا طالبی[3]

۱ و ۲ – به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
۳- استادیار، دانشکده کشاورزی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۹

چکیده

حاجی برات، ز.، سعیدی، ع. و طالبی، ر. ۱۳۹۵. ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) براساس صفات مورفولوژیک و نشانگر**های** CDDP و SCoT. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۲:** ۲۱۴- ۲۰۱.

شناسائی ژنوتیپ‌هائی با تنوع ژنتیکی در گیاهان، یکی از عوامل کلیدی برای نگهداری ژرم‌پلاسم و پتانسیل مواد اصلاحی برای آینده است. به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی سی ژنوتیپ نخود بااستفاده از ۱۱ نشانگر CDDP (DNA محرک محافظت شده) و ۹ نشانگر SCoT (کدون‌های آغاز هدف) استفاده شد. ژنوتیپ‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی باسه تکرار درمزرعه دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج کاشته شدند. در طول آزمایش برخی صفات مانند عملکرد دانه، تعداد بذر درغلاف، شاخص برداشت، وزن صد دانه، عملکرد بیولوژیک گیاه و ارتفاع گیاه یادداشت‌برداری انجام شد. بر اساس نتایج، ماتریس فاصله ژنتیکی در محدوده‌ای بین ۰/۲۴ تا ۰/۷۷ برای نشانگر CDDP و بین ۰/۳۷ تا ۰/۸۸ برای نشانگر SCoT محاسبه شد. درصد چند شکلی نشانگرهای CDDP، ۹۱ درصد و نشانگرهای SCoT، ۸۸ درصد بود که تقریباً مشابه بودند. تجزیه خوشه‌ای نشانگرهای مولکولی و مورفولوژیک، ژنوتیپ‌ها را به سه گروه تقسیم‌بندی کرد. نتایج مطالعه نشان داد نشانگرهای CDDP و SCoT نسبت به دیگر روش‌ها از قدرت تفکیک پذیری بسیار بالایی در آشکارسازی تنوع و اطلاعات ژنومی برخوردار هستند. نشانگرهای CDDP وSCoT به عنوان سیستم‌های مولکولی جدید برای ارزیابی ژرم‌پلاسم نخود قابل توصیه هستند.

واژه‌های کلیدی: نخود، تنوع ژنتیکی، نشانگر SCoT، نشانگر CDDP، صفات مورفولوژیکی، تجزیه خوشه‌ای.

نویسنده مسئول: abbas.saidi@gmail.com تلفن: ۰۲۱۲۲۴۳۱۹۶۴

مقدمه

نخود (*Cicer arietinum* L.) گیاهی دانه‌ای با ارزش غذایی بالا و از سومین حبوبات مهم دنیا بعد از سویا و لوبیا است که درحدود ۱۵درصد (۹/۳ میلیون تن) از کل محصولات حبوبات جهانی را به خود اختصاص داده است (Anonymous, 2007). علاوه بر این نخود، منبع غنی از پروتئین برای رژیم غذایی انسان در نواحی حاره‌ای و نیمه‌حاره‌ای است. نخود نقش مهمی در حاصلخیزی خاک به ویژه در مناطق خشک برعهده دارد (Choudhary *et al*., 2012). برای اصلاح نخود و نیز نگهداری و حفظ ذخایرتوارثی آن بررسی تنوع موجود بین ژنوتیپ‌های نخود از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Tilman and Wedin, 1996). بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان با استفاده از صفات مورفولوژیک وبیوشیمیایی همواره متداول بوده است (Chtourou-Ghorbel *et al*., 2002). اگر چه نشانگرهای مورفولوژیکی به طورسنتی در علوم زیستی مورد استفاده قرارگرفته‌اند ولی دارای محدودیت‌های اساسی هستند که موجبات توجه محققین این علوم به انواع دیگر نشانگرهای ژنتیکی را فراهم آورده است (Gharehyazi, 1996). ارزیابی صفات مورفولوژیکی درمقایسه با دیگر روش‌ها ارزان و با سهولت انجام می‌شود، اما به دلیل وابستگی این صفات با شرایط محیطی، خطا در اندازه‌گیری آن‌ها بالا است (Jannatabadi *et al*., 2014)، بنابراین برای ارزیابی تنوع ژنتیکی استفاده از روش اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک به تنهایی جواب‌گو نبوده و باید از ارزیابی مولکولی همراه با مورفولوژیک استفاده شود.

نشانگرهای مولکولی ابزار قدرتمندی برای بررسی روابط ژنتیکی درمیان ژنوتیپ‌ها را فراهم می‌کند (Schuster *et al*., 2009؛ Maccaferri *et al*., 2003). مطالعه تنوع ژنتیکی نخود زراعی بااستفاده از نشانگرهای DAMDوSSR انجام و سطح قابل قبولی از تنوع ژنتیکی توسط محققان گزارش شد (Sefera *et al*., 2011). با توجه به رشد فوق‌العاده پایگاه داده‌های عمومی زیستی، توسعه نشانگرهایی که در مجاورت و یا درون ژن‌های منتخب قرار دارند به طورقابل ملاحظه‌ای تسهیل شده است (Andersen and Lubberstedt, 2003). با آغاز روند عبور از نشانگرهای DNA تصادفی به سمت نشانگرهای اختصاصی متصل شونده به ژن‌های خاص، سیستم‌های نشانگری جدیدی موسوم به چندشکلی DNA حفاظت شده CDDP (Collard and Mackill, 2009a) و چند شکلی کدون‌های آغاز SCoT (Collard and Mackill, 2009b) توسعه یافتند که مبتنی ر مناطق حفاظت شده هستند. نشانگر SCoT براساس تنوع در ناحیه حفاظت شده کدون آغاز هدف عمل می‌کند.

این مناطق عموماً شامل دامین‌هایی در ارتباط

با توالی‌های حفاظت شده DNA درون ژن هستند. مناطق حفاظت شده DNA اغلب در گونه‌های مختلف گیاهی حفظ شده‌اند. در مقایسه با روش RAPD، در این روش از پرایمرهایی با طول بیشتر و با دمای اتصال بالاتر استفاده می‌شود که در نتیجه باعث بهبود قابلیت تکثیر می‌شود. علاوه بر این، روش مذکور روی مناطق ژنی متمرکز است و به همین دلیل در برنامه‌های کاربردی نظیر نقشه‌یابی QTL ها مزیت‌هایی نسبت به نشانگرهای تصادفی دارد (Andersen and Lubberstedt, 2003).

اساساً روش‌های CDDP و SCoT مشابه روش ISSR هستند زیرا در هر دو مورد از یک پرایمر واحد به عنوان پرایمرهای Forward و Reverse استفاده می‌شود (Collard and Mackill, 2009a؛ Gorji *et al*., 2011). این تحقیق به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی نخود با استفاده از نشانگرهای مولکولی و صفات مورفولوژیکی و همچنین تعیین روابط ژنتیکی میان نوتیپ‌ها بود.

مواد و روش‌ها

دراین تحقیق سی ژنوتیپ نخود از مرکز بین‌المللی تحقیقات مناطق خشک و نیمه خشک (ایکاردا) و موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه شد. ژنوتیپ‌های مورد استفاده درقالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج کاشته شدند. هر کرت آزمایشی شامل خطوطی که به فاصله ۵۰ سانتی‌متر و فواصل دو بوته روی ردیف ۱۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد و طول خطوط کاشت ۲ متر بود. به منظور تجزیه واریانس و آماره‌های توصیفی از نرم‌افزار SPSS استفاده شد و صفات مورفولوژیک نظیر عملکرد دانه، تعداد بذر درغلاف، شاخص برداشت، وزن صددانه، عملکرد بیولوژیک گیاه و ارتفاع گیاه اندازه‌گیری شد.

به منظور ارزیابی تنوع مولکولی، از برگ‌های تازه روییده و جوان DNA با استفاده از روش CTAB تغییر یافته استخراج شد (Saghai-Maroof *et al*., 1984). پس از استخراج DNA و قبل از انجام واکنش PCR، جهت بررسی کمیت و کیفیت اسیدهای نوکلئیک، DNA به دست آمده با اسپکتروفتومتر (ND1000) در طول جذب ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. پس از تعیین غلظت نمونه‌های DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از ۱۱ نشانگر CDDP و ۹ نشانگر SCoT انجام شد.

اجزای واکنش ۲۵ میکرولیتر PCR شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر (۱۰ برابر)، ۲ میکرولیتر DNA ژنومی (۴۰ نانوگرم)، ۰/۹ میکرولیتر کلریدمنیزیم (۵۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر آغازگر (۱ میکرومولار)، ۰/۲۵ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی (۱۰ میلی‌مولار) و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز (۱ واحد در میکرولیتر) و ۱۷/۳۵ میکرولیتر آب مقطر بودکه طبق برنامه PCR زیر تکثیر شدند:

یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه واسرشت سازی در دمای۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در۴۸ درجه سانتی‌گراد به مدت۴۰ ثانیه و مرحله سنتز به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. به منظور آشکارسازی چند شکلی بین نمونه‌ها از دستگاه الکترفورز و ژل آگارز متافور ۱ درصد استفاده شد و رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید ۱ میکروگرم در میکرولیتر انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی

امتیازدهی براساس وجود و یا عدم وجود نوار به ترتیب با اعداد ۱و۰ برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار Excle انجام شد. برای به دست آوردن ماتریس فاصله ژنتیکی ازنرم‌افزار(NTSYS pc (Ver 2.02 استفاده شد. آزمون مانتل برای مقایسه ماتریس‌های عدم تشابه با دندروگرام‌های به دست آمده توسط نشانگرهای CDDP و SCoT با نرم‌افزار NTSYS محاسبه شد.

برای گروه‌بندی و تفسیر روابط ژنتیکی از روش تجزیه خوشه‌ای NJ و توسط نرم‌افزار DARwin 5.0.128 استفاده شد (Perrier *et al.*, 2003). پارامترهای ژنتیکی (محتوای اطلاعات چندشکلی و شاخص نشانگر) نیز با استفاده از نرم‌افزارهای مربوطه محاسبه شدند. مقادیر PIC برای هر جفت آغازگر بر پایه رابطه $PIC = \sum[2Pi(1-Pi)]$ (Roldan-Ruiz *et al.*, 2000) محاسبه شد، که در آن Piبرابر با فراوانی آلل تکثیر شده و (1-Pi) فراوانی آلل غایب در نظر گرفته شد.

شاخص نشانگر (Marker Index: MI) بر اساس تعداد باندهای چندشکل در هر واحد سنجش و با استفاده از معادله $MI = DI \times EMR$ محاسبه شد. در این رابطه DI شاخص تنوع (Diversity Index) و EMR ضریب موثر چندگانه (Effective Multiplex Ratio) هستند که $DI = 1-\sum p_i^2$ و $EMR = np\beta i$ است. Pi فراوانی آلل i ام، np تعداد مکان‌های چندشکل و βi نسبتی از مکان‌های چند شکل و به صورت $\beta = n_{np}/(np+\beta)$ محاسبه شد که n_{np}تعداد مکان‌های تک شکل است (Roldan-Ruiz *et al.*, 2000). برای صحت دندروگرام حاصل، استرپ با تکرار ۱۰۰ انجام شد.

نتایج و بحث

نام و منشاء ژنوتیپ‌های نخود مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ و نشانگرهای استفاده شد در جدول ۲ نشان داده شده‌اند.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی اندازه‌گیری شده برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های آزمایشی جدول ۳ و آماره‌های توصیفی مربوط به تنوع صفات مورفولوژیکی در جدول ۴ آورده شده است.

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های نخود و منشاء آن‌ها

Table 1. Names of chickpea genotypes and their origin

ردیف No.	نام ژنوتیپ Genotype name	منشا Origin	ردیف No.	نام ژنوتیپ Genotype name	منشا Origin
1	ILCCV2	ICARDA	16	ILC3279	ICARDA
2	ILC482	Iran	17	Flip2005.1c	ICARDA
3	Flip2005.5C	ICARDA	18	LMR153	ICARDA
4	LMR144	ICARDA	19	ILC588	ICARDA
5	SEL93th2446	ICARDA	20	Flip2005.3c	ICARDA
6	Azad	Not traced-Iran	21	LMR81	ICARDA
7	Hashem	Not traced-Iran	22	Piruz	Not traced-Iran
8	Flip04.13c	ICARDA	23	Flip04-119.c	ICARDA
9	ILC533	ICARDA	24	ILC263	ICARDA
10	Flip03.27c	ICARDA	25	Kaka	Not traced-Iran
11	Flip03-109C	ICARDA	26	Jam	Not traced-Iran
12	LMR159	ICARDA	27	ILC3397	ICARDA
13	LMR29	ICARDA	28	Flip5187-3C	ICARDA
14	ILC1929	ICARDA	29	LMR165	ICARDA
15	Arman	Not traced-Iran	30	LMR134	ICARDA

جدول ۲- نشانگرهای CDDP و SCoT و توالی آن‌ها

Table 2. CDDP and SCoT markers and their sequences

CDDP		SCoT	
نام نشانگر Marker name	توالی (′۳ تا ′۵) Sequence (5′ to 3′)	نام نشانگر Marker name	توالی (′۳ تا ′۵) Sequence (5′ to 3′)
ABP1	ACSCCSATCCACCGC	SCoT36	GCAACAATGGCTACCACC
ERF1	CACTACCGCGGSCTSCG	SCoT28	CCATGGCTACCACCGCCA
ERF2	GCSGAGATCCGSGACCC	SCoT20	ACCATGGCTACCACCGCG
HEDVQ	CACGAGGACCTSCAGG	SCoT11	AAGCAATGGCTACCACCA
Knox1	AAGGGSAAGCTSCCSAAG	SCoT1	CAACAATGGCTACCACCA
Knox2	CACTGGTGGGAGCTSCAC	SCoT35	CATGGCTACCACCGGCCC
MYB2	GGCAAGGGCTGCCGG	SCoT2	CAACAATGGCTACCACCC
MYB1	GGCAAGGGCTGCCGC	SCoT22	AACCATGGCTACCACCAC
WRKY-R1	GTGGTTGTGCTTGCC	SCoT13	ACGACATGGCGACCATCG
WRKY-F1	TGGCGSAAGTACGGCCAG		
MADS1	ATGGGCCGSGGCAAGGTGC		

بیشترین واریانس مربوط به شاخص برداشت وکمترین واریانس مربوط به صفت تعداد بذر در غلاف بود که حاکی از وجود تنوع ژنتیکی کم در جمعیت مورد بررسی بود. بیشترین ضریب تغییرات مربوط به عملکرد دانه و کمترین ضریب تغییرات مربوط به وزن صد دانه و تعداد بذر درغلاف بود (جدول ۴).

تعداد بذر درغلاف از وراثت‌پذیری بالایی

جدول ۳- تجزیه واریانس شش صفت مورفولوژیکی در سی ژنوتیپ نخود

Table 3. Analysis of variance for six morphological traits in thirty chickpea genotypes

S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	ارتفاع گیاه Plant height	عملکرد بیولوژیک Biomas	تعداد بذر درغلاف Seed/ pod	عملکرد Seed yield	وزن صد دانه 100 seed weight	شاخص برداشت Harvest index
Block	بلوک	2	0.89	136.14**	119.40*	19.12*	61.77*	88.58**
Genotype	ژنوتیپ	29	64.77**	359.13**	415.24**	57.41**	150.14**	192.23**
Error	خطا	58	0.37	15.72	27.14	2.78	10.77	9.14

جدول ۴- برآورد آماره توصیفی شش صفت مورفولوژیکی در سی ژنوتیپ نخود

Table 3. Descriptive statistics estimation for six morphological traits in thirty chickpea genotypes

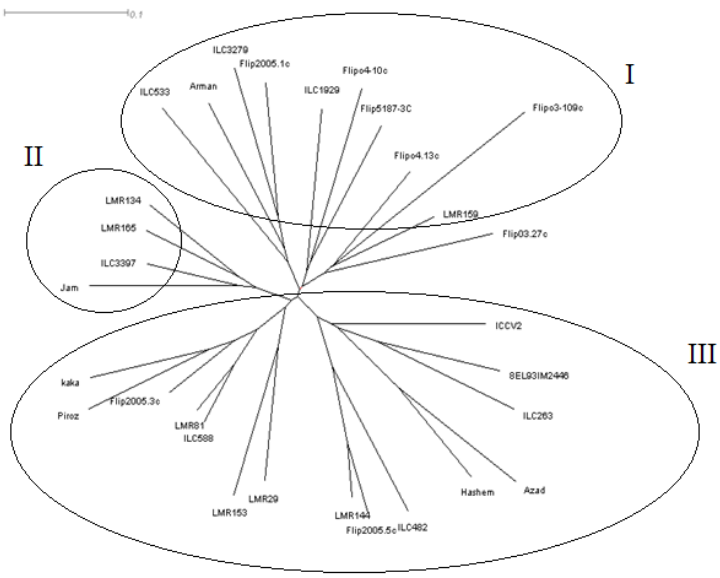
Treats	صفات	مینیمم Min.	ماکزیمم Max.	میانگین Mean	واریانس Variance	میانه Median	ضریب تغییرات CV (%)	درصد وراثت پذیری Hereditability (%)
Harvest index	شاخص برداشت	6.6	22.25	12.51	17.59	12.35	33.53	51
100-seed weight	وزن صد دانه	64.0	77.00	69.20	11.48	68.00	4.89	67
Seed yield (g plant^{-1})	عملکرد دانه	0.5	6.55	3.15	1.69	3.10	41.29	44
Number of seeds/pod	تعداد بذر درغلاف	0.6	0.87	0.69	0.004	0.68	9.15	81
Plant biomass	بیومس گیاه	5.6	27.14	15.59	33.22	14.29	36.98	49
Plant height	ارتفاع گیاه	21.0	49.00	29.77	40.12	25.17	8.65	88

برخوردار بود که این صفت قابل انتقال به نسل بعد است. بررسی واریانس صفات به دست آمده از جدول ۴ نشان می‌دهد که صفات تعداد بذر درغلاف وعملکرد دانه تنوع کم را نشان دادند. صفاتی مانند عملکرد دانه و عملکرد بیولوژیک گیاه از وراثت پذیری پایینی برخوردار بودند. صفاتی مانند عملکرد دانه وتعداد بذر درغلاف وشاخص برداشت ضریب تغییرات بالایی رانشان دادند و ارتفاع گیاه کمترین ضریب تغییرات را داشت که نشان می‌دهد تنوع این نوع صفت پایین است.

براساس تجزیه خوشه‌ای داده‌های حاصل ازمطالعه صفات مورفولوژیکی ژنوتیپ‌های مورد بررسی به سه کلاستر گروه‌بندی شد. کلاستر اول شامل ۱۱ ژنوتیپ و کلاستردوم شامل ۴ ژنوتیپ و کلاسترسوم شامل ۱۵ ژنوتیپ بود (شکل ۱).

تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی

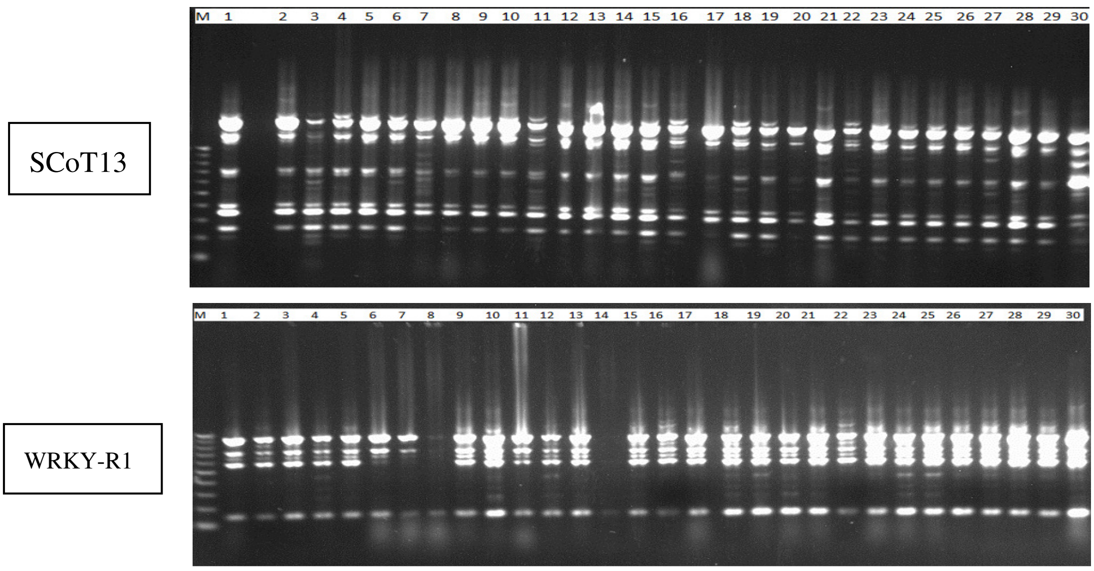
مقادیر محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) برای هر جفت نشانگر، به همراه نوع نشانگرها و تعداد نوارهای چند شکل و شاخص نشانگر محاسبه شد (جدول ۵). شکل ۲ الگوی باندی به دست آمده از هر دو نشانگر را نشان می‌دهد.



شکل ۱- تجزیه کلاستر سی ژنوتیپ نخود بر اساس صفات مورفولوژیکی با استفاده از روش

Neighbor-Joining

Fig. 1. Dendrogram of thirty chickpea genotypes based on morphological traits using Neiber- Joining method



شکل ۲- الگوی نواری نشانگرهای WRKY-R1 و SCoT13 در ژنوتیپ‌های نخود

Fig. 2. Banding pattern of WRKY-R1and SCoT13 markers in some chickpea genotypes

Numbers to 30 above the bands are genotypes number (Table 1)   اعداد ۱ تا ۳۰ بالای باندها، شماره ژنوتیپ‌ها هستند (جدول ۱).

جدول ۵- مشخصات نشانگرهای CDDP و SCoT مورد استفاده
Table 5. Characteristics of used SCoT and CDDP markers

نوع نشانگر Type of marker	نشانگر Marker	تعداد باند پلی مورف Number of polymorphic bands	تعداد باند منومورف Number of monomorphic bands	کل باند Number of amplified bands	درصد چندشکلی Polymorphism (%)	میزان شاخص محتوای چند شکلی PIC	شاخص نشانگر MI
SCoT	SCoT28	12	1	13	92	0.46	5.52
	SCoT35	13	5	18	72	0.46	5.98
	SCoT13	20	1	21	95	0.46	9.20
	SCoT1	10	2	12	83	0.46	4.60
	SCoT36	13	2	15	87	0.45	5.85
	SCoT2	18	0	18	100	0.46	8.28
	SCoT22	15	1	16	94	0.48	7.12
	SCoT20	14	0	14	100	0.43	6.02
	SCoT11	18	0	18	100	0.47	8.46
CDDP	ABP1	17	0	17	100	0.46	7.82
	ERF1	16	0	16	100	0.46	7.36
	ERF2	9	5	14	64	0.44	3.96
	HEDVQ	16	0	16	100	0.45	7.20
	Knox1	15	3	18	83	0.46	6.90
	knox2	15	0	15	100	0.45	6.75
	MYB2	10	1	11	91	0.45	4.50
	MYB1	15	0	15	100	0.45	6.75
	WRKY-R1	9	1	10	90	0.40	3.60
	WRKY-F1	19	0	19	100	0.46	8.74
	MADS1	14	2	16	87	0.44	6.16

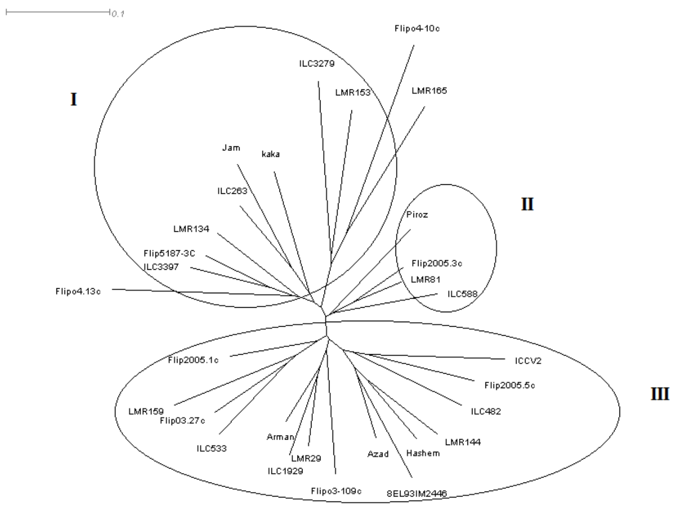
مجموع کل نوارهای به دست آمده ازنشانگر ۱۴۴SCoTو ازبین این تعداد، ۱۲۶ نوار چند شکل بودند. میزان شاخص محتوای چند شکلی نشانگر SCoT از۰/۴۱ تا ۰/۴۸ با میانگین ۰/۴۵ مشاهده شد. بیشترین و کمترین میزان شاخص محتوای چند شکلی به ترتیب مربوط به نشانگر SCoT 22 با مقدار ۴۸ درصد و نشانگر SCoT20 با مقدار ۴۳ درصد بود.

تعداد باندهای تکثیر شده با استفاده از نشانگر CDDP در دامنه بین۱۱ تا ۱۹باند به دست آمد و درصد چند شکلی کل باندها ۹۱ درصد محاسبه شد. مجموع کل نوارها ۱۶۲ برآورد شد که از این تعداد،۱۴۸ نوار چند شکل بودند. میزان شاخص محتوای چند شکلی از ۰/۴۰ تا ۰/۴۶ متغییر بود و میانگین آن ۰/۴۵ محاسبه شد. بیشترین و کمترین میزان شاخص محتوای چند شکلی به ترتیب مربوط به نشانگرهای ABPI، ERF1 و WRKY-R1 به میزان ۰/۴۰ و ۰/۴۶ بود.

مقادیر محاسبه شده شاخص نشانگر در آغازگرهای SCoT در محدوده بین ۴/۶ تا ۹/۲ و نشانگرCDDP در محدوده بین ۳/۶ تا ۸/۷۴ برآورد شد. بیشترین مقدار شاخص نشانگر(MI) متعلق به نشانگر SCoT13 بود که نشان دهنده قدرت تفکیک بالای این نشانگر نسبت به سایر نشانگرها بود (جدول ۵)براساس داده‌های

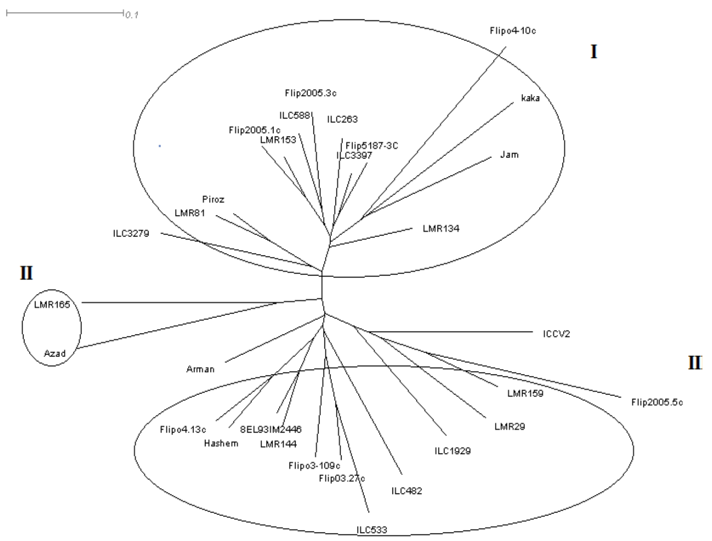
SCoT تشابه ژنتیکی بین نمونه‌ها از ۰/۲۸ تا ۰/۸۱ متغیر بود و میانگین آن‌ها بین تمامی جفت نمونه‌ها ۰/۵۵ و برای داده‌های CDDP تشابه ژنتیکی بین ۰/۲۴ تا ۰/۷۷ متغیرو میانگین آن‌ها ۰/۵۱ بین جفت نمونه‌ها تعیین شد.

روابط ژنتیکی بین نشانگرها با استفاده از تجزیه کلاستر برای SCoT و CDDP در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. بر این اساس ژنوتیپ‌ها به سه گروه تقسیم‌بندی شدند (شکل‌های ۳ و ۴).



شکل ۳- تجزیه کلاستر سی ژنوتیپ نخود با استفاده از نشانگرهای SCoT به روش Neighbor-Joining

Fig. 3. Dendrogram of thirty genotypes of chickpea using SCoT markers based on Neighbor-Joining method



شکل ۴- تجزیه کلاستر سی ژنوتیپ نخود با استفاده از نشانگرهای CDDP به روش Neighbor-Joining

Fig. 4. Dendrogram of thirty genotypes of chickpea using CDDP markers based on Neighbor-Joining method

کلاستر دوم و سوم در هر دو نشانگر به دو زیرکلاستر تقسیم‌بندی شد و کلاستر سوم بیشترین تعداد ژنوتیپ‌ها را به خود اختصاص داد. الگوی گروه‌بندی در نشانگر SCoT و CDDP نسبتاً مشابه بود. بر اساس آزمون مانتل، همبستگی مثبتی بین نشانگرها دیده شد، در نتیجه می‌توان گفت که هر دو نشانگر نتایج یکسانی را نشان دادند یا به عبارت دیگر ارزیابی مشابهی از روابط ژنتیکی توسط هر دو نشانگر آشکار شد. استفاده از آزمون مانتل جهت مطالعه و تحلیل تنوع ژنتیکی محصولات زراعی به ویژه معلوم کردن تطابق، ماتریس‌های حاصل از سیستم نشانگری مختلف روی یک مجموعه ژنوتیپ توسط محققان توصیه شده است (Mohammadi and Prasanna, 2003).

نتایج پژوهشی در برنج نشان داد که نشانگر CDDP بیشترین کارایی واطلاعات‌دهی رابرای بررسی انگشت‌نگاری نسبت به نشانگرهای دیگر که مبتنی بر میانگین درصد پلی‌مورفیسم بودند، داشت (Gorji *et al.*, 2011). گروه‌بندی ژنوتیپ‌های انگور توسط نشانگرهای ISSR و RAPD و SCoT نشان داد که از بین نشانگرهای موردمطالعه، نشانگر SCoT، تکرار پذیرتر بوده و توانایی تمایز و تفکیک بهتر ژنوتیپ‌های انگور را داشتند (Jones *et al.*, 1997). به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۴۰ رقم گندم اصلاح شده ایرانی از دو نشانگر CDDP و SCOT استفاده شد. نتایج ارزیابی مولکولی نشان داد که نشانگرهای CDDP و SCOT توانایی بالایی در ارزیابی تنوع و تفکیک‌پذیری ارقام گندم را داشتند (Hamidi *et al.*, 2014).

نشانگرهای SCoT و CDDP نشانگرهای پلی‌مورف هستند که برای انگشت‌نگاری تشخیصی در بررسی تنوع ژنتیکی نخود برای اولین بار در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند. براساس میانگین درصد پلی‌مورفیسم و شاخص محتوی چندشکلی، کارایی نشانگرهای SCoT و CDDP برای انگشت نگاری ژنوتیپ‌های نخود نسبتا یکسان بود. سطح نسبتاً پایین همبستگی بین این دو نشانگر مولکولی ($r = 0.37$, $P<0.05$) نشان می‌دهد که به احتمال زیاد این دو نشانگر به قسمت‌های مختلفی از ژن (که شامل کدون آغاز هدف و توالی محافظت شده ژنی) اتصال یافته‌اند (Sonia and Gopalakrishna, 2007؛ Arif *et al.*, 2009). تفاوت‌های بین دندروگرام نشانگرهای مختلف می‌تواند به دلیل ماهیت طبیعی نشانگرها باشد. از این نشانگرها برای مقایسه مناطق عملکردی ژن‌ها استفاده می‌شود و تعداد لوکوس‌ها و سطح پلی‌مورفیسم ژنوتیپ‌ها نیز با این نشانگرها تعیین می‌شود (Souframanien and Gopalakrishna, 2004).

نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی برای تولید ارقام هیبرید و امیدبخش مورد استفاده قرار گیرد. این مطالعه نه تنها برای بررسی منشاء این محصول، بلکه برای مدیریت منابع ژنتیکی و استفاده‌های آن در

برنامه‌های به‌نژادی کاربردی، به ویژه برای توسعه یک کلکسیون ژنتیکی کاربرد دارد. اطلاعات موجود در مورد تنوع ژنتیکی پژوهشگران را قادر می‌سازد که ژرم‌پلاسم در دسترس را به گروه‌های هتروتیک مختلف طبقه‌بندی کنند که از اهمیت ویژه‌ای در برنامه‌های مبتنی بر تلاقی نخودبرخوردار است. برنامه‌های پیشین تلاقی در بسیاری از موسسات تحقیقاتی ایران تنها مبتنی بر خصوصیات فنوتیپی بوده‌اند.

مطالعه حاضر اهمیت مطالعات مولکولی (مارکرهای ارزان، سریع و اطلاعات دهنده) را تایید کرد که می‌تواند در کنار اطلاعات مورفولوژیکی در تشخیص تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و در انتخاب والدین متنوع و مناسب برای انجام یک برنامه به‌نژادی موفق مبتنی بر تلاقی مورد استفاده قرار گیرد. به طور خلاصه، یک روش جدید نشانگر DNA که بخش خاصی از ژنوم گیاه یا ژن‌های منتخب را از طریق طراحی پرایمر مورد هدف قرار می‌دهد، برای تجزیه و تحلیل تنوع نخود استفاده شده است. این روش روی بستر آگارز اجرا می‌شود و بنابراین ساده و نسبتاً ارزان است. این نشانگرها می‌توانند جایگزین مناسبی برای نشانگرهای تصادفی مثل RAPD یا ISSR باشند وهمچنین می‌توانند برای نقشه‌یابی QTL، تجزیه تفرق بالک و کاربردهای بررسی تنوع ژنتیکی در تجزیه و تحلیل ژنتیکی گیاه مورد استفاده قرار گیرند (Wang *et al.,* 2009).

نتایج این پژوهش نشان داد نشانگرهای (SCoT و CDDP) به خوبی توانایی شناسایی پلی‌مورف را دارند و می‌توان ازنشانگر CDDPبه عنوان مکمل سایرنشانگرها برای آنالیز ژنتیکی و تهیه نقشه صفات کمی استفاده کرد. وجود عدم همبستگی میان کارایی نشانگرهای مولکولی و مورفولوژیکی را می‌توان ناشی از دلایل مختلفی باشد. این نتیجه می‌تواند دلالت بر این داشته باشد که دو سیستم برآوردهای متفاوتی از روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها دارند. همچنین این نتایج ممکن است ناشی از آن باشد که تنوع در سطح مولکولی، خنثی است و ممکن است منعکس‌کننده تنوع در سطح فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی نباشد. علاوه بر این داده‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی بر اساس صفاتی هستند که ممکن است جهت انعکاس تنوع واقعی بین ژنوتیپ‌ها این صفات مناسب نباشند. این نتایج چندان دور از انتظار نیست چرا که نتایج فنوتیپی از توارث‌پذیری بسیار پایینی برخوردار هستند و هیچ مدرکی وجود ندارد که همبستگی صفات ژنتیکی و فنوتیپی را نشان دهد.

References

Andersen, J. R., and Lubberstedt, T. 2003. Functional markers in plants. Trends in Plant Science 8: 554-560.

Anonymous 2007. FAO Statistics. http://www.fao.org.

Arif, M., Zaidi, N. W., and Singh, Y. P. 2009. A comparative analysis of ISSR and RAPD markers for study of genetic diversity in Shisham (*Dalbergia sissoo*). Plant Molecular Biology Report 27: 488-495.

Choudhary, P., Khanna, S. M., Jain, P. K., Bharadwaj, C., Kumar, J., Lakhera, P. C., and Srinivasan, R. 2012. Genetic structure and diversity analysis of the primary gene pool of chickpea using SSR markers. Genetics and Molecular Research 11: 891-905.

Chtourou-Ghorbel, N., Lauga, B., Brahim, N. B., Combes, D., and Marrakchi, M. 2002. Genetic variation analysis in the genus Lathyrus using RAPD markers. Genetic Resources and Crop Evolution 49: 363-370.

Collard, B.C.Y., and Mackill, D.J. 2009a. Conserved DNA-derived polymorphism (CDDP): A simple and novel method for generating DNA markers in plants. Plant Molecular Biology Report 27: 558-562.

Collard, B. C. Y., and Mackill, D. J. 2009b. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. Plant Molecular Biology Report 27: 86-93.

Gharehyazi, B. 1996. Application of DNA markers in plant breeding. Proceedings of the 4th Iranian Congress on Crop Production and Plant Breeding, Isfahan, Iran (in Persian).

Gorji, A. M., Poczai, P., Polgar, Z., and Taller, J. 2011. Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. American Journal of Potato Research 88: 226-237.

Hamidi, H., Talebi, R., and Keshavarzi, F. 2014. Comparative efficiency of functional gene-based markers,start codon targeted polymorphism (SCoT) and conserved dNA-derived polymorphism (CDDP) with ISSR markers for diagnostic fingerprinting in wheat (*Triticum aestivum* L.). Cereal Research Communications 42: 558-567.

Jannatabadi, A. A., Talebi, R., Armin, M., Jamalabadi, J., and Baghebani ,N. 2014. Genetic diversity of Iranian landrace chickpea (*Cicer arietinum* L.) accessions from different geographical origins as revealed by morphological and sequence tagged

microsatellite markers. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 23: 225-229.

Jones, C. J., Edwards, K. J., Castaglione, S., Winfield, M. O., Sala, F., van deWiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevschi, A., Marmiroli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A., and Karp, A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Molecular Breeding 3:381-390.

Maccaferri, M., Sanguineti, M.C., Donini, P., and Tuberosa, R. 2003. Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm. Theoretical and Applied Genetics 107: 783-797.

Mohammadi, S. A., and Prasanna, B. M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plant-salient statistical tools and consideration. Crop Science 43: 1235-1248.

Perrier, X., Flori, A., and Bonnot, F. 2003. Data analysis methods. Pp. 43-76. In: Hamon, P., Seguin, M., Perrier, X., and Glaszmann, J. C. (eds.) Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants. Science Publishers. Enfield. Montpellier, France.

Roldan-Ruiz, I., Dendauw, J., van Bockstaele, E., Depicker, A., and De Loose, M. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). Molecular Breeding 6: 125-134.

Saghai-Maroof, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A., and Allard, R. W. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dymnamics. Proceedings of National Academy of Sciences, USA 81: 8014-8018.

Schuster, I., Vieira, E. S. N., da Silva, G. C., de Assis Franco, F., and Marchioro, V. S. 2009. Genetic variability in Brazilian wheat cultivars assessed by microsatellite markers. Genetics and Molecular Biology 32: 557-563.

Sefera, T., Abebie, B., Gaur, P. M., and Assefa, K. 2011. Characterization and genetic diversity analysis of selected chickpea cultivars of nine countries using simple sequence repeat (SSR) markers. Crop Pasture Science 62: 177-187.

Sonia, C., and Gopalakrishna, T. 2007. Comparative assessment of REMAP and ISSR marker assays for genetic polymorphism studies in *Magnaporthe grisea.* Current Science 93: 688-692.

Souframanien, J., and Gopalakrishna, T. 2004. A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. Theoretical and Applied Genetics 109: 1687-1693.

Tilman, D., and Wedin, D. 1996. Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystem. Nature: 718-720.

Wang, Q., Zhang, B., and Lu, G. 2009. Conserved region amplification polymorphism (CoRAP), a novel marker technique for plant genotyping in *Salvia miltiorrhiza*. Plant Molecular Biology Report 27: 139-143.